

Evaluation of the Effects of Plant Growth Regulators on Callus Induction and Micropropagation of *Anthurium andreaeanum* under *In Vitro* Conditions

Pages
25-38

N. Rezaie¹, M. Soltani Howyzeh^{2*} and Sh. Sadat³

- 1) Department of Plant Breeding, Khuzestan Science Research Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran.
1, 2 & 3) Department of Genetics and Plant Breeding, Ahv.C., Islamic Azad University, Ahvaz, Iran.

*Corresponding author: mehdisoltani@iau.ac.ir

Received date: 2024.06.30

Accepted date: 2024.10.05

Abstract

Anthurium is one of the most beautiful flowers in the world and the most economically important genus of the Araceae family, possessing secondary metabolites with notable medicinal properties. Propagation of this plant through seeds and lateral shoots is highly challenging due to high trait segregation and prolonged flowering time. These days, tissue culture is proposed as a rapid and efficient method for its propagation. This study aimed to develop an effective protocol for callus induction, regeneration, and micropropagation of anthurium. In this research, young stems of the plant were subjected to five sterilization treatments. The results demonstrated that using 20% sodium hypochlorite along with 0.1% mercuric chloride for 15 minutes yielded the best sterilization outcome. For callus induction, MS medium containing 2 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L BAP was identified as the most suitable combination. Additionally, various treatments were evaluated for shoot regeneration and rooting, with the optimal hormonal combination consisting of KIN and NAA. For micropropagation, the highest efficiency was achieved with 1 mg/L 2iP combined with 0.3 and 0.5 mg/L NAA. The findings of this study confirmed that tissue culture-based methods can serve as an effective strategy for rapid anthurium propagation. Moreover, culture media supplemented with plant growth regulators significantly influenced various stages of the plant's growth and multiplication. Finally, the produced plantlets were successfully transferred to a research greenhouse after acclimatization in perlite substrate, exhibiting optimal growth.

Keywords: Tissue culture, Sterilization, Regeneration, Adaptation and Rooting.

بررسی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر کالوس‌زایی و ریزازدیادی گیاه آنتوریوم (*Anthurium andreanum*)

در شرایط کشت درون شیشه‌ای

شماره صفحات

۲۵-۳۸

ناهید رضایی^۱، مهدی سلطانی حویزه^{۲*} و شهاب سادات^۲

۱) گروه اصلاح نباتات، پردیس علوم تحقیقات خوزستان، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران.
۲، ۳) گروه ژنتیک و بهنژادی گیاهی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران.

* نویسنده مسئول: mehdisoltani@iau.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۱۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۱۰

چکیده

آنتوریوم یکی از زیباترین گل‌های جهان و مهم‌ترین جنس اقتصادی خانواده آراسه است که دارای متابولیت‌های ثانویه با خواص دارویی قابل توجه است. تکثیر این گیاه از طریق بذر و جوانه‌های جانبی به دلیل تفرق بالای صفات و طولانی بودن زمان گل‌دهی، بسیار مشکل است. امروزه کشت بافت به‌عنوان یک روش سریع و کارآمد برای تکثیر این گیاه پیشنهاد می‌شود. این پژوهش با هدف ارائه پروتکلی مؤثر برای تولید کالوس، باززایی و ریزازدیادی آنتوریوم انجام شد. در این مطالعه، ساقه‌های جوان گیاه تحت پنج تیمار سترون‌سازی قرار گرفتند و نتایج نشان داد که استفاده از هیپوکالریت سدیم ۲۰ درصد به همراه با کلرور مرکوریک ۰/۱ درصد به مدت ۱۵ دقیقه، بهترین نتیجه را در ضدعفونی نمونه‌ها داشت. برای القای کالوس، محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP مناسب‌ترین ترکیب شناخته شد. همچنین، تیمارهای مختلفی برای باززایی و ریشه‌زایی بررسی شدند و بهترین ترکیب هورمونی شامل KIN و NAA بود. در ریزازدیادی، ترکیب ۱ میلی‌گرم در لیتر 2ip به همراه ۰/۳ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بالاترین کارایی را داشت. نتایج این مطالعه نشان داد که روش‌های مبتنی بر کشت بافت می‌توانند به‌عنوان راهکاری مؤثر برای تکثیر سریع آنتوریوم مورد استفاده قرار گیرند. همچنین، محیط‌های کشت حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی به‌طور قابل توجهی بر مراحل مختلف رشد و تکثیر این گیاه تأثیرگذار بودند. در نهایت، گیاهچه‌های تولیدشده پس از طی مراحل سازگاری در بستر پرلیت، با موفقیت به گلخانه تحقیقاتی منتقل شدند و رشد مطلوبی را نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: کشت بافت، سترون‌سازی، باززایی، سازگاری و ریشه‌زایی.

مقدمه

آنتوریوم با نام انگلیسی Laceleaf و نام علمی *Anthurium Andraeanum* متعلق به خانواده Araceae می‌باشد. آنتوریوم گیاه دائمی گلخانه‌ای با ریشه‌های ضخیم و گوشتی و برگ‌هایی است که در انواع اشکال مختلف و بسیار متنوع دیده می‌شود (Vargas et al., 2004). گیاه آنتوریوم علاوه بر ارزش زینتی و زیبایی ظاهری، دارای خواص دارویی قابل توجهی است که به متابولیت‌های ثانویه آن از جمله فلاونوئیدها و پروآنتوسیانیدین‌ها نسبت داده می‌شود. این ترکیبات نه تنها در رنگدانه‌های گیاه نقش دارند، بلکه دارای مزایای بالقوه‌ای برای سلامتی از جمله اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی هستند. انواع مختلفی از فلاونوئیدها، از جمله آنتوسیانین‌ها، فلاون گلیکوزیدها و فلاونول گلیکوزیدها، در اسپات‌های *A. andraeanum* شناسایی شده‌اند. به‌ویژه، سه نوع آنتوسیانین و چندین فلاونوئید گلیکوزیدی شناسایی شده که نقش آن‌ها در رنگ اسپات و مزایای بالقوه آن‌ها برای سلامتی مشخص شده است (Li et al., 2013; Osorio-Guarín et al., 2021). متابولیت‌های پروآنتوسیانیدین‌ها که از مسیر بیوسنتزی فلاونوئیدها تولید می‌شوند، با مقاومت در برابر تنش‌های محیطی و رنگ‌دانه‌سازی مرتبط هستند. عوامل رونویسی AaMYB3 و AabHLH1 تنظیم‌کننده‌های تجمع پروآنتوسیانیدین‌ها هستند که نشان‌دهنده‌ی مبنای ژنتیکی برای افزایش این ترکیبات سودمند است (Li et al., 2019). تکنولوژی کشت بافت، محققین را در تشکیل سریع کلون و ریزازدیادی ژنوتیپ‌های گیاهی مطلوب یاری نموده و بدین منظور از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود (Bahmankar et al., 2024; Biglari farash et al. 2024; Maira et al., 2010; Sadat-Noori et al., 2018). گیاهان یکنواخت و عاری از بیماری در کشاورزی و باغبانی و صنایع دارویی استفاده شده و به منظور بررسی مطالعه وقوع تنوع سوماکلونال در این پدیده از نشانگرهای مولکولی استفاده می‌شود (Bahmankar et al. 2024; Alizadeh et al., 2016; RahimBarshi et al., 2024; Sadat et al., 2011). در یک مطالعه Khorramirad et al (2011) برای تولید کالوس، از ریز نمونه‌های برگ و دم‌برگ گیاه آنتوریوم گونه‌های *Antadra* و *Casino*، بر روی محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) حاوی انواع تنظیم‌کننده‌های رشد نفتالین استیک اسید (NAA)، بنزیل آدنین (BA)، کایننتین (Kin) و ایندول استیک اسید (IBA) استفاده نمودند. بیشترین مقدار کالوس با ۳ میلی‌گرم در لیتر BA، و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید، در شرایط تاریکی تولید شد. بیشترین تعداد گیاهچه از کالوس، با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA، ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، در شرایط روشنایی بدست آمد. هشت هفته پس از کشت در حدود ۲۲/۸۳ گیاهچه در هر سانتیمتر مربع از بافت کالوس مشاهده شد. بهترین محیط ریشه‌زایی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر Kin، ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بوده است، که تعداد ۱۱/۵ ریشه برای هر گیاهچه تولید نمود. گونه *Antadra* در تولید کالوس و شاخساره نسبت به گونه *Casino* برتر بوده است. اما در فرآیند ریشه‌زایی گونه *Casino* واکنش بهتری نشان داده است (Khorrami Raad et al., 2011). در یک مطالعه Martin et al (2003) نیز محیط کشت MS با یک غلظت کاهش یافته را بر کالوس‌زایی آنتوریوم مورد آزمایش قرار دادند و مشخص شد که محیط MS

با ۱/۴ غلظت مواد معدنی برای تکثیر و پرآوری بافت کالوس کافی است. آنها همچنین گزارش نمودند که تشکیل کالوس در قسمت‌های پایینی برگ از قسمت‌های بالایی بهتر بوده است (Martin *et al.*, 2003). تشکیل کالوس با استفاده از غلظت‌های مختلف هورمون‌های دی کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-D) و بنزیل آمینو پورین (BAP) به‌طور مؤثری القا می‌شود. به‌عنوان مثال، در وارپته‌ی Lambada از آنتوریوم آندرانوم، بهترین میزان کالوس‌زایی در محیط MS حاوی ۶/۷۸ میکرومولار 2,4-D و ۲/۲۲ میکرومولار BAP مشاهده شد (del Rivero *et al.*, 2006). در مطالعه‌ی دیگر، رویان‌های نارس که در محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP کشت شدند، کارایی بالای کالوس‌زایی را نشان دادند، به‌طوری‌که به‌طور میانگین نه گیاه از هر کالوس باززایی شدند (Mireles-Ordaz *et al.*, 2015). همچنین، Rezaie *et al.* (2012) در یک مطالعه برگ‌های آنتوریوم گونه‌های *Cassis*, *Rapido*, *Tropical*, *Choco* را پس از ضد عفونی در محیط کشت Kuehnl با سطوح مختلف هورمون TDZ به همراه سطوح مختلف هورمون NAA و غلظت بالای ساکارز جهت القای جنین‌زایی کشت نمودند. گونه *Tropical* در محیطی با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بیشترین میزان جنین‌زایی را نشان داد (Kalantary & Mashayekhi, 2013). با توجه به خواص دارویی و خواص زینتی گفته شده به نظر می‌رسد ایجاد تنوع ژنتیکی در این گیاه با استفاده از روش‌های جدید می‌تواند با ارزش و سودمند باشد. از طرفی دیگر با توجه به زیبایی این گیاه دستیابی به پروتوکول‌های ریزازدیادی در جهت تکثیر کلون آن برای بازار داخلی و نیز خارجی می‌تواند از نظر اقتصادی با اهمیت باشد بخصوص که تکثیر از طریق کشت بافت دارای سرعت عمل بالاتر و همچنین حجم بالاتر در فضای کمتری را به همراه دارد. لذا این پژوهش با هدف ارائه پروتکلی مؤثر برای تولید کالوس، باززایی و ریزازدیادی آنتوریوم انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش پس از تهیه برگ‌های جوان گیاه آنتوریوم، و انتقال آن‌ها به آزمایشگاه دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز، به مدت نیم ساعت در زیر آب جاری قرار داده شدند. سپس قطعات ۱ سانتی‌متری برگ‌های جوان تحت پنج تیمار سترون‌سازی (شامل هیپوکلرید سدیم ۲۰ درصد به همراه با کلرور مرکوریک ۰/۱ درصد به مدت پنج، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ دقیقه) در زیر هود با چهار تکرار قرار گرفتند. جهت کالوس‌زایی شش تیمار کالوس‌زایی در یک طرح فاکتوریل کاملاً تصادفی با ۴ تکرار مورد بررسی قرار گرفتند. تعداد ریزنمونه در هر پتردیش ۱۵ عدد بود. 2,4-D در دو سطح (۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) و BAP در ۳ سطح (۰/۱، ۰/۳ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) در محیط MS پایه، تیمارهای کالوس‌زایی را تشکیل دادند. به منظور باززایی کالوس‌ها، Kin در ۳ سطح (۱/۵ و ۲ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر) و NAA در ۴ سطح (۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۱۵ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) در محیط MS پایه مورد استفاده قرار گرفت. کالوس‌های کشت شده به اتاق رشد با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در محدوده دمایی 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند. واکشت کالوس‌ها هر ۳ هفته

یکبار روی محیط مشابه انجام گرفت. پس از ۵ هفته، اولین نوشاخه‌ها ظاهر شدند. نوشاخه‌های به طول تقریبی ۸-۷ سانتی‌متری به محیط‌های کشت ریشه‌زایی انتقال یافتند. پنج تیمار ریشه‌زایی در محیط MS با نصف غلظت نیترات به عنوان محیط پایه برای تیمارهای ریشه‌زایی به‌همراه تیمارهای هورمونی (شامل: بدون هورمون، به همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA، به همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA، به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA) در نظر گرفته‌شد. محیط‌های کشت ریشه‌زایی به اتاق رشد با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در محدوده دمایی 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند. پس از سه هفته، تعداد نوشاخه‌های ریشه‌دار برای هر تیمار شمارش و تجزیه واریانس داده‌ها، جهت بررسی اثرات تیمارها انجام شد. جهت تکثیر انبوه، نه تیمار در یک طرح فاکتوریل کاملاً تصادفی در ۴ تکرار بررسی شد. محیط MS پایه به عنوان محیط پایه انتخاب و تلفیقی از هورمون‌های دوایزوپنتیل آدنوزین (2ip) و NAA انتخاب گردیدند. 2ip در ۳ سطح (۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم) و NAA نیز در ۳ سطح (۰/۱، ۰/۳ و ۰/۵) مورد استفاده قرار گرفتند. تمامی آنالیزهای آماری مرتبط با صفات اندازه‌گیری شده شامل درصد ریزنمونه‌های سترون، درصد کالوس‌زایی، درصد ریشه‌زایی و درصد باززایی با استفاده از نرم افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ انجام شد. رسم نمودارها نیز با استفاده از نرم افزار اکسل انجام شد.

نتایج و بحث

سترون‌سازی

جدول ۱ نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اعمال تیمارهای سترون‌سازی را نشان می‌دهد. اختلاف معنی‌دار این تیمارها در سطح $\alpha = 0/01$ بود. تیمار ۳ شامل هیپوکلیت سدیم ۲۰ درصد به همراه با کلرور مرکوریک ۰/۱ درصد به مدت ۱۵ دقیقه با ۹۰ درصد ریزنمونه سالم و سترون شده بیشترین تاثیر را در سترون‌سازی ریزنمونه‌های حاصل از شاخه‌های جوان آنتوریوم به همراه داشته است و با بقیه تیمارها اختلاف معنی‌داری دارد (شکل ۱). تحقیقات نشان دادند که استفاده از هیپوکلیت سدیم ۲ درصد در سترون‌سازی ریزنمونه‌ها جهت سترون‌سازی سطحی اکثر گونه‌های گیاهی به عنوان یکی از مواد سترون‌کننده موثر، پیشنهاد شده است (Farsi & Zolali, 2003). مطالعات مختلفی جهت ضد عفونی گیاه آنتوریوم در شرایط کشت بافت، از هیپوکلیت سدیم استفاده نمودند (Bakhshi Khaniki et al., 2011; Elowni et al., 2024). همچنین استفاده از کلرور جیوه ۰/۱ درصد تا ۱ درصد به مدت ۲ تا ۱۰ دقیقه با توجه به نوع بافت گیاهی، جهت سترون‌سازی مفید می‌باشد (Fauzan & Tajuddin, 2017).

کالوس‌زایی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس تیمارهای مختلف کالوس‌زایی (جدول ۲) نیز نشان داد که بین عامل A (اکسین) و نیز عامل B (سیتوکینین) و نیز اثر متقابل آنها اختلاف معنی‌داری در سطح $\alpha = 0/01$ وجود دارد. در این تلفیق هورمونی، نشان داد که

تیمار ۳ شامل محیط MS پایه به همراه 2,4-D به میزان ۲ میلی‌گرم در لیتر و BAP به مقدار ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر، با ۶۷/۵ درصد، بهترین نتیجه را در کالوس‌زایی ریزنمونه‌های حاصل از شاخه‌های جوان به همراه داشته‌است.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس و روند تغییرات پاسخ به تیمارهای مختلف سترون‌سازی، در گیاه آنتوریوم
Table1- Analysis of variance result and changes in response to different treatments sterilization process in *anthurium* plant

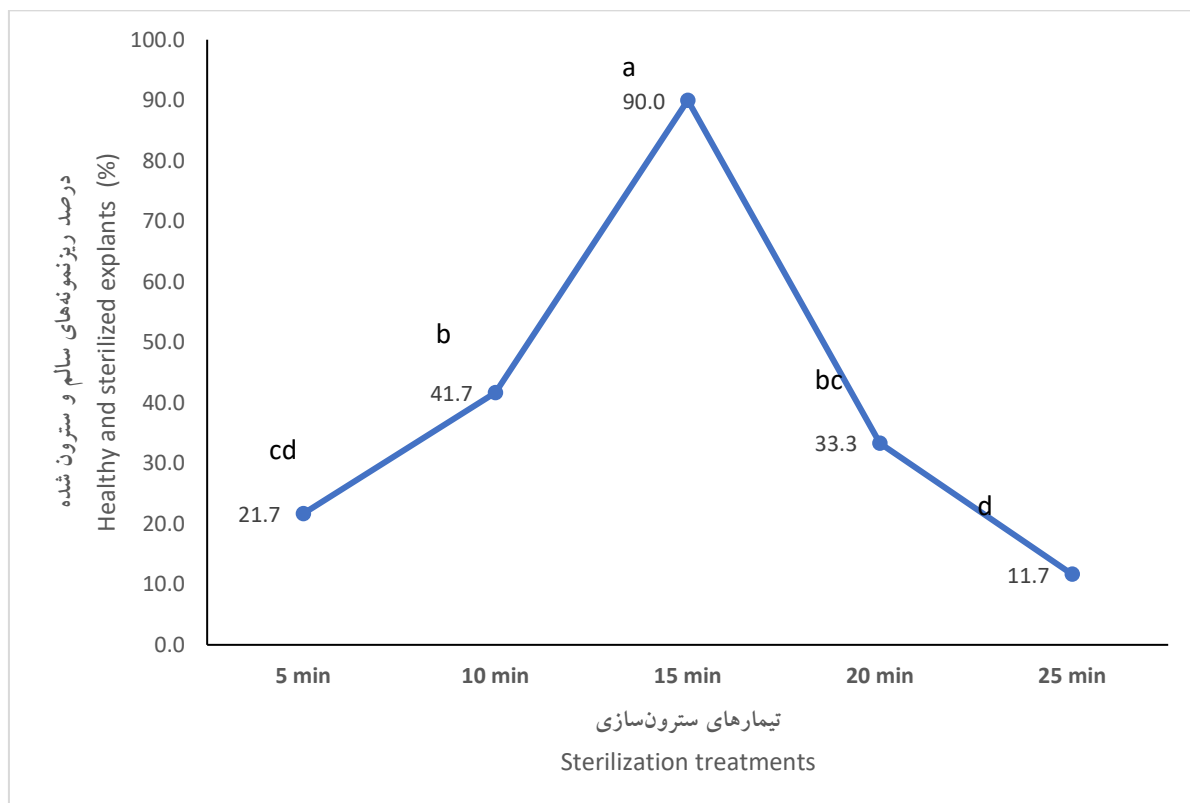
میانگین مربعات Means of Square	درجه آزادی Degree Freedom	منابع تغییر Source of variation
83.92**	4	تیمار سترون‌سازی Sterilization treatment
17.3**	1	رگرسیون خطی Linear regression
258.01**	1	درجه دوم Second degree
0.5	1	درجه سوم Third degree
98.05**	1	انحراف از درجه ۳ [±] ±Deviation of the 3rd degree
0.85	15	خطا Error
18.04	19	کل Total
CV = 15.25		

** = ۰/۰۱ معنی دار در سطح

** = Significant at 0.01

± جزء «انحراف از درجه ۳» عدم برازش مدل رگرسیون درجه سوم را ارزیابی می‌کند.

The 'deviation from the 3rd degree' component evaluates the lack of fit of the third-degree regression model ±



شکل ۱- تیمارهای سترون‌سازی، میانگین درصد ریزنمونه‌های سالم و سترون شده برای هر تیمار، و اختلافات بین تیمارها از طریق آزمون دانکن ($\alpha=0/01$) در گیاه آنتوریوم

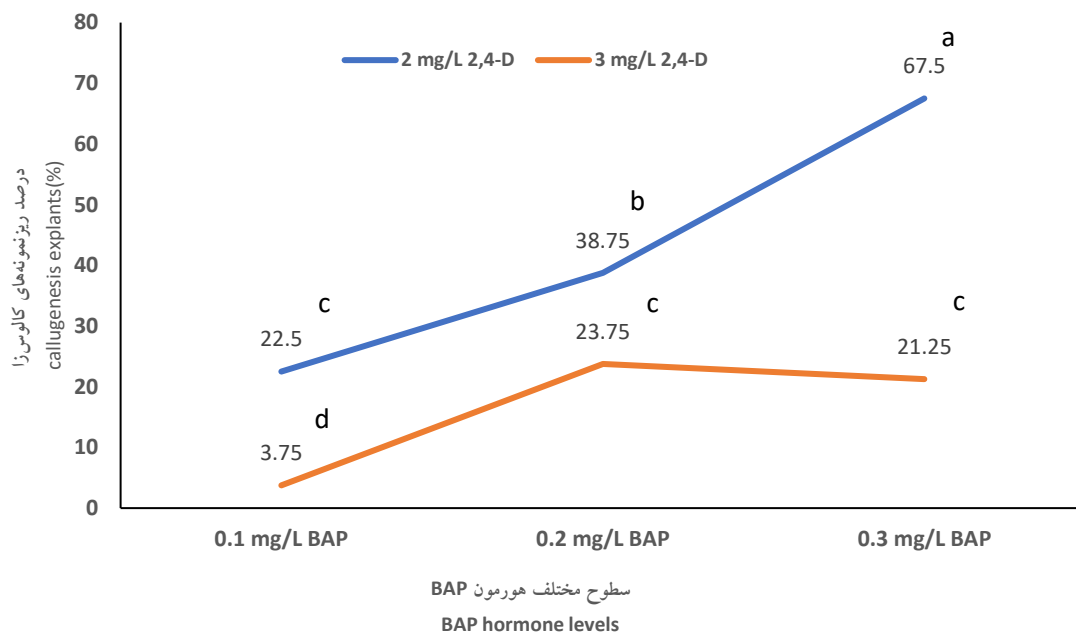
Figure1- Sterilization treatments, percent of healthy and sterilized explants for each treatment, and differences among treatments by Duncan test ($\alpha=0.01$).

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس تیمارهای مختلف کالوس‌زا در گیاه آنتوریوم

Table 2: The result of different treatments for callus induction of *Anthurium* plant

میانگین مربعات Means of square	درجه آزادی Degree Freedom	منبع تغییرات Source of variation
180.66**	1	عامل A (2-4-D)
79.79**	2	عامل B (BAP)
25.29**	2	اثر متقابل AB Interaction AB
0.96	18	خطا Error
18.3	23	کل Total

C.V=15.42

**معنی داری در سطح ۱ درصد
** Significant level at 1%

شکل ۲- تیمارهای کالوس‌زایی، درصد ریزنمونه‌های کالوس‌زا برای هر تیمار و اختلافات بین تیمارها از طریق آزمون دانکن ($\alpha=0.01$) در گیاه آنتوریوم

Figure 2- Callus induction treatments, the percent of callus induction explants for each treatment and differences among treatments by Duncan ($\alpha=0.01$) in anthurium.

باززایی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس تیمارهای مختلف باززایی (جدول ۳) نیز نشان داد که بین عامل A (سیتوکینین)، عامل B (اکسین) و نیز اثر متقابل آنها اختلاف معنی‌داری در سطح $\alpha=0.01$ وجود دارد. نتایج آزمون دانکن نیز نشان دهنده این بود که تیمارهای، شامل محیط MS پایه به همراه Kin به میزان ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر و NAA به مقدار ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر، با ۵۵ درصد کالوس‌زایی شده، تیمار شامل محیط MS پایه به همراه Kin به میزان ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر و NAA به مقدار ۰/۱۵ میلی‌گرم در لیتر، با ۵۰ درصد کالوس‌زایی شده و نیز تیمار شامل محیط MS پایه به همراه Kin به میزان ۲/۵ میلی‌گرم

در لیتر و NAA به مقدار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر، با ۵۰ درصد کالوس باززایی شده، بیشترین تاثیر را در باززایی از کالوس‌های حاصل از گیاه آنتوریوم به همراه داشتند. علت انتخاب سیتوکینین BAP از میان سایر سیتوکینین‌ها در این تحقیق این است که نتایج تحقیقات متعددی نشان داده‌اند که BAP بعنوان موثرترین سیتوکینین در میان سایر سیتوکینین‌ها برای باززایی کالوس در اکثر گونه‌های گیاهی است (Cárdenas-Aquino et al., 2023; Chai et al., 2024; Smeringai et al., 2023).

جدول ۳: نتایج تجزیه واریانس تیمارهای مختلف باززایی در گیاه آنتوریوم

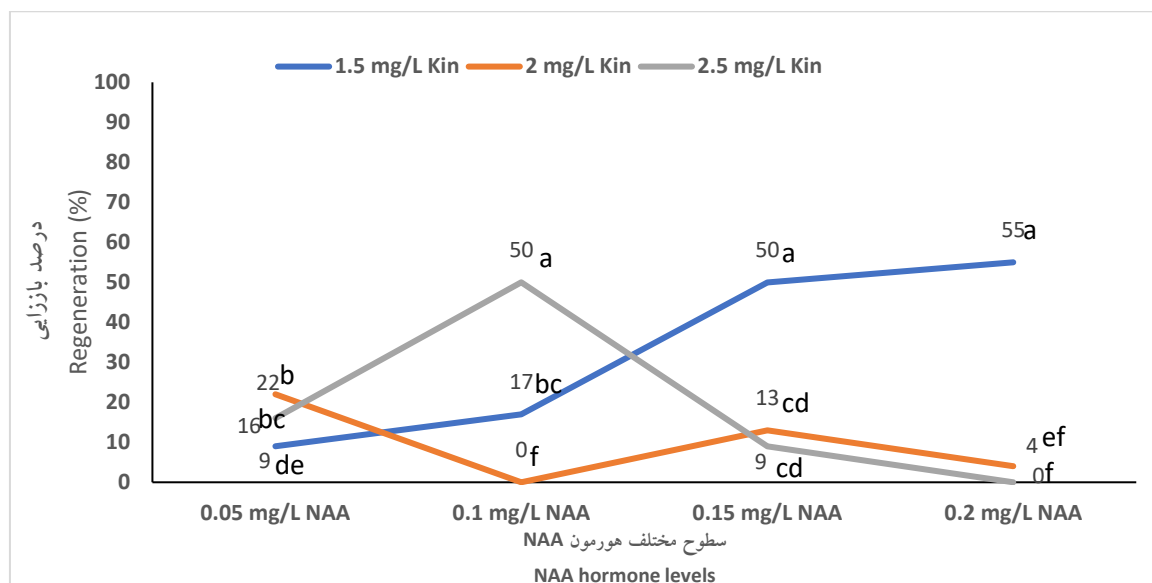
Table 2: The result of different treatments for regeneration of *Anthurium* plant

میانگین مربعات Means of squar	درجه آزادی Degree Freedom	منبع تغییرات Source of variation
233**	2	عامل A (kin) A Factor (Kin)
19.6**	3	عامل B (NAA) B Factor (NAA)
119.4**	6	اثر متقابل AB Interaction AB
0.57	36	خطا Error
23.4	47	کل Total

C.V=14.33

**معنی داری در سطح ۱ درصد

** Significant level at 1%



شکل ۳- تیمارهای باززایی، درصد کالوس‌های باززایی شده (نوشاخه‌ها) برای هر تیمار و اختلافات بین تیمارها از طریق آزمون دانکن (=۰/۰۱) در گیاه آنتوریوم.

Figure 3- Regeneration treatments, the percent of regenerated explants for each treatment and differences among treatments by Duncan test ($\alpha=0.01$) in *Anthurium* plant.

ریشه‌زایی

نتایج تجزیه واریانس تیمارهای مختلف ریشه‌زایی (جدول ۴-۴)، نیز بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار تیمارها در سطح

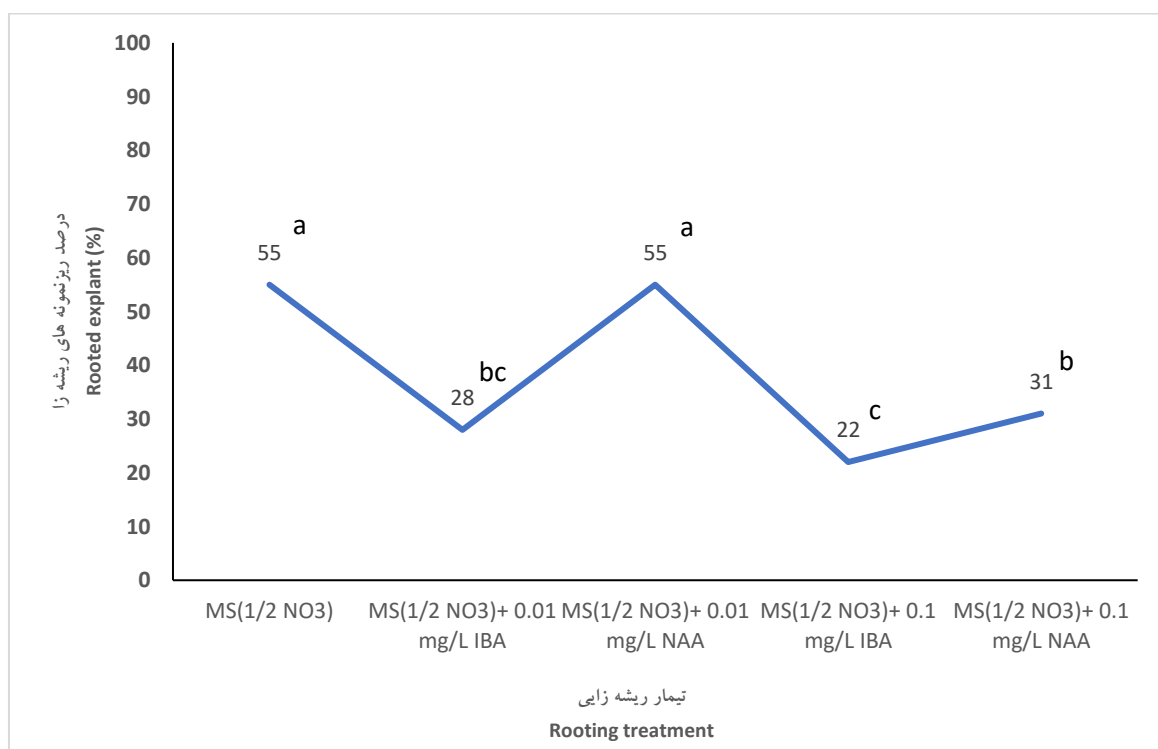
$\alpha = 0.01$ بود. نتایج آزمون دانکن (شکل ۴-۴) نشان داد که تیمار ۱ شامل محیط MS با $1/2$ نیترات، و نیز تیمار ۳ شامل محیط MS با $1/2$ نیترات به همراه 0.01 میلی‌گرم در لیتر NAA، هر دو با ۵۵ درصد نوشاخه ریشه‌زا بیشترین تأثیر را در ریشه‌زایی نوشاخه‌های به دست آمده از کالوس را دارا بودند و با بقیه تیمارها اختلاف معنی‌داری داشتند. علت استفاده از نیترات به میزان نصف، نیز آن است که کاهش غلظت مواد معدنی در محیط MS به این میزان، بعنوان محیط پایه برای ریشه‌زایی اکثر گیاهان مفید است (Kuleshova et al., 2023; Weng et al., 2022). شکل ۵ مراحل مختلف سترون سازی، کالوس‌زایی، باززایی و ریشه‌زایی گیاه آنتوریوم را در این تحقیق نشان می‌دهد.

جدول ۴: نتایج تجزیه واریانس تیمارهای مختلف ریشه‌زایی در گیاه آنتوریوم
Table 4: The result of different treatments for root genesis of *Anthurium* plant

میانگین مربعات Means of square	درجه آزادی Degree Freedom	منبع تغییرات Source of variation
67.42**	4	ریشه‌زایی Root genesis
0.98	15	خطا Error
14.6	19	کل Total

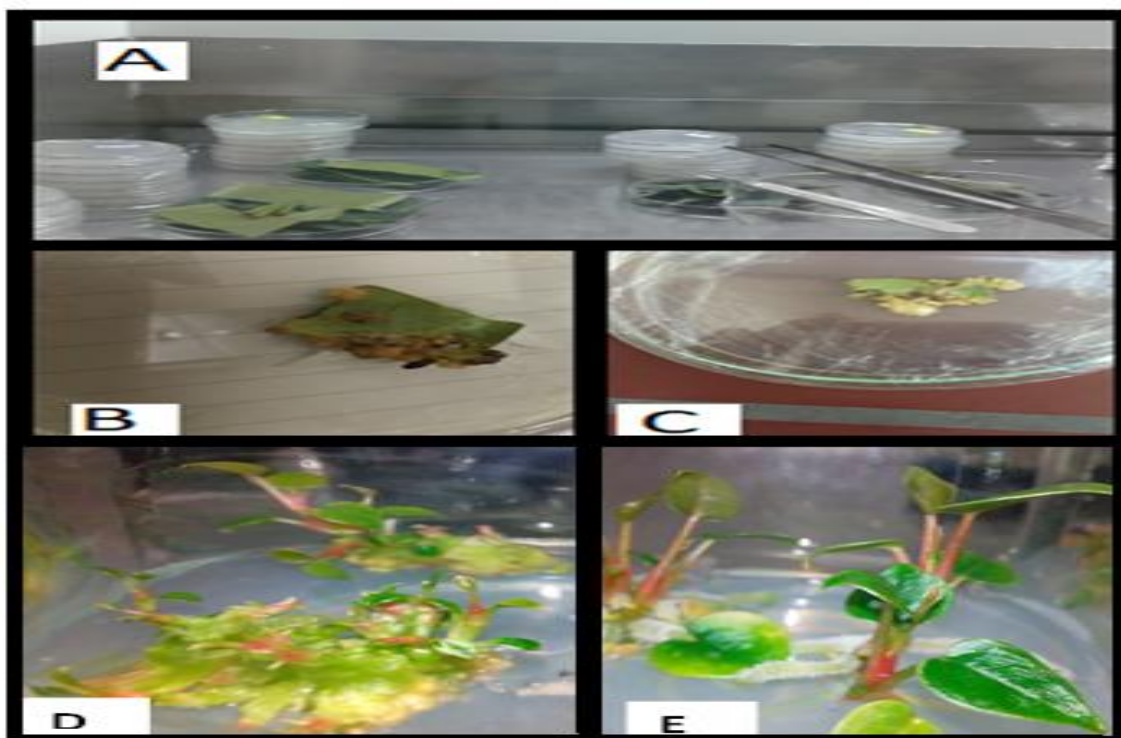
C.V=9.8

**معنی‌داری در سطح ۱ درصد
** Significant level at 1%



شکل ۴- تیمارهای ریشه‌زایی، درصد نوشاخه‌های ریشه‌زا برای هر تیمار و اختلافات بین تیمارها از طریق آزمون دانکن ($\alpha=0.01$) در گیاه آنتوریوم

Figure 4- Rooting treatments, the percent of new branches root genesis for each treatment and differences among treatments by Duncan ($\alpha=0.01$) in anthurium plant.

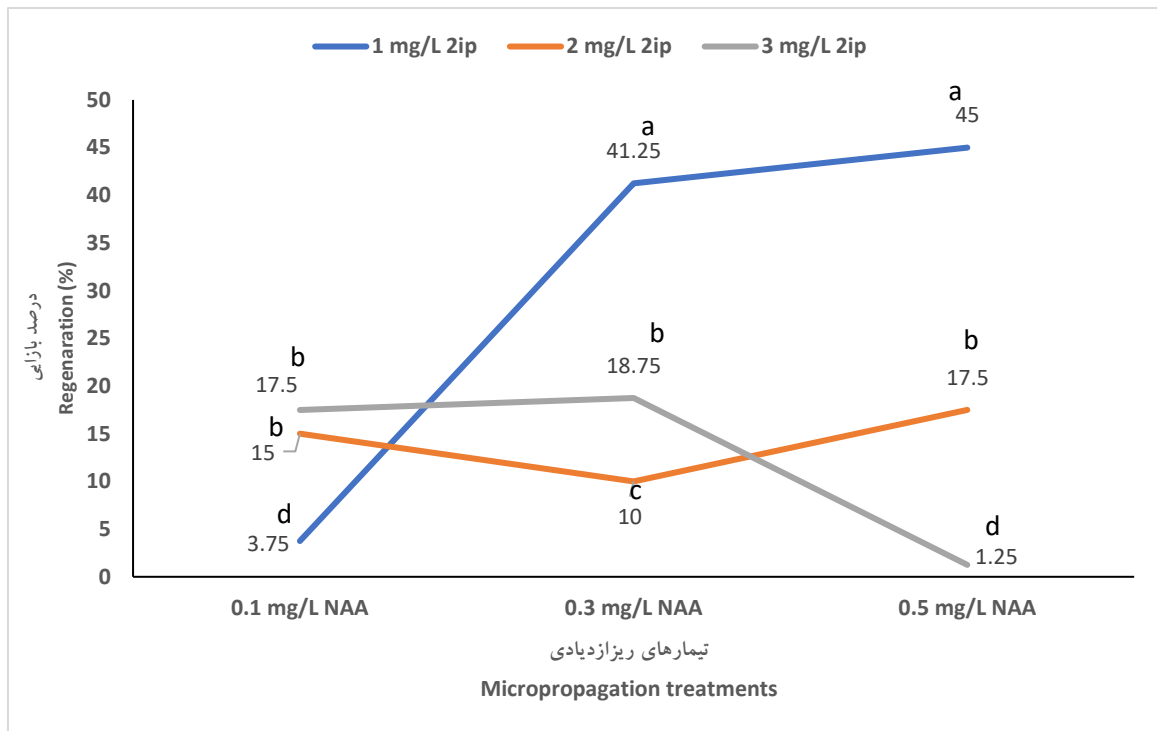


شکل ۵- A: سترون سازی ریزنمونه ها زیر هود لامینار، B و C: انتقال ریزنمونه سترون به محیط کشت، کالوس‌زایی در گیاه آنتوریوم و دستیابی به کالوس، شکل D: و باززایی گیاهچه از کالوس، E: جداسازی نوشاخه از کالوس و انتقال به محیط کشت ریشه‌زایی.
Figure 5- A: Sterilization of explants under a laminar flow hood. B & C: Transfer of sterilized explants to culture medium, callogenesis in Anthurium plants, and callus induction. D: Plantlet regeneration from callus. E: Separation of shoots from callus and transfer to rooting culture medium.

ریزازدیادی

جهت تکثیر انبوه، ۹ تیمار ریزازدیادی در یک طرح فاکتوریل کاملاً تصادفی در ۴ تکرار بررسی شد. محیط MS پایه به عنوان محیط پایه انتخاب و تلفیقی از هورمون‌های 2ip و NAA انتخاب گردیدند. 2ip در ۳ سطح (۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم) و NAA نیز در ۳ سطح (۰/۱، ۰/۳ و ۰/۵) مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج تجزیه واریانس داده‌های بدست آمده را برای تیمارهای ریزازدیادی برای گیاه آنتوریوم نشان می‌دهد. این نتایج نشان دهنده اختلاف معنی‌دار این تیمارها در سطح $\alpha = 0/01$ بود. تیمارهای ۱ میلی‌گرم در لیتر 2ip به همراه ۰/۵ و همراه NAA ۰/۳ با ۴۵ و ۴۱/۵ درصد به ترتیب بهترین تیمارهای باززایی بودند. یکی از اجزاء ضروری هر برنامه اصلاحی که برای بهبود ژنتیکی گیاهان طراحی می‌شود، تنوع ژنتیکی است. به نظر می‌رسد پتانسیل عظیمی در تکنولوژی کشت بافت گیاهی در جهت ایجاد تنوع ژنتیکی از طریق دستیابی به پروتوکول‌های کالوس‌زایی وجود دارد. تغییر در بعضی از صفات این گیاه از طریق تنوعات سوماکلونی می‌تواند مدت زمان لازم برای یک برنامه اصلاحی را بیش از پیش کوتاه نماید. ثابت شده است که کشت طولانی مدت کالوس و حضور بعضی از اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها در محیط کشت و در پروسه کشت بافت، احتمال تنوعات سوماکلونی را به شدت می‌افزاید. گیاهان باززایی شده از کالوس و کشت‌های سلولی، حساس به تنوعات سوماکلونی هستند (Khorrami Raad *et al.*, 2011; Niazian *et al.*, 2021; Praveen &

(Nair, 2014) زیرا این تنوعات، مسیر طبیعی را برای رشد، توسط مریستم‌های بعدی دنبال نمی‌کنند (Bakhshi Khaniki *et al.*, 2011; Farsi & Zolali, 2003). گیاهانی که از کالوس باززایی می‌شوند، مستعد تولید واریانت‌های سوماکلونی برای صفات مختلفی نظیر عملکرد بالا، مقاومت به بیماری، بردباری به خشکی، زودرسی و غیره هستند (Nazir *et al.*, 2019; Bahmankar *et al.*, 2024; Vargas *et al.*, 2004).



شکل ۶- تیمارهای ریزادیدادی، درصد ریزنمونه‌های باززا شده برای هر تیمار و اختلافات بین تیمارها از طریق آزمون دانکن ($\alpha=0/01$) در گیاه آنتوریوم.

Figure 6- Micropropagation treatments, percent of regenerated explants per treatment, and differences between treatments analyzed using Duncan's test ($\alpha = 0.01$) in Anthurium.

نتیجه‌گیری

این مطالعه موفق به ارائه یک پروتکل بهینه برای ریزادیدادی، القای کالوس و باززایی گیاه آنتوریوم آندرانوم در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای شد. مؤثرترین تیمار سترون‌سازی شامل استفاده از هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد به همراه با کلرور مرکوریک ۰/۱ درصد به مدت ۱۵ دقیقه بود که ۹۰ درصد ریزنمونه‌ها را سالم و سترون نگه داشت. القای کالوس با استفاده از محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر ۲،۴-D و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر BAP به بیشترین میزان کالوس‌زایی (۶۷/۵ درصد) دست یافت. برای باززایی شاخه، محیط کشت MS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA بهترین نتیجه را با ۵۵ درصد باززایی نشان داد. ریشه‌زایی به‌طور بهینه در محیط کشت MS با نصف غلظت نیترات و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA انجام شد. در ریزادیدادی، ترکیب ۱ میلی‌گرم در لیتر Zip با ۰/۳ تا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بیشترین کارایی (۴۱/۵ تا ۴۵

درصد) را در تولید شاخه‌های جدید داشت. گیاهچه‌های تولیدشده پس از سازگاری در بستر پرلیت و انتقال به گلخانه تحقیقاتی، رشد مطلوبی را نشان دادند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که ترکیب مناسب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نقش کلیدی در بهبود کارایی کشت بافت برای گیاه آنتوریوم دارد و راهکاری مؤثر برای تکثیر سریع و حفظ ژنتیکی این گونه با ارزش اقتصادی فراهم می‌کند.

منابع

- Alizadeh, Z., Ahmadi, D. N., Mohammadi, M., Karimizadeh, R. A., Memari, H. R., & Bahmankar, M. (2016). Assessment of molecular variation in pea germplasm using RAPD markers. *Electronic J. of Bio*, 12(1), 22-27.
- Bakhshi Khaniki, G., Ghasemi, M., & Bairamizadeh, E. (2011). Study of Micropropagation of Anthurium Andreanum Using Tissue Culture [Research Article]. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*, 1(4), 79-87. <http://ncmbjpiiau.ir/article-1-32-fa.html>
- Bahmankar, M., Rahnama, H., Salehi, M., & Noori, S. A. S. (2024). Somatic embryogenesis and genetic fidelity in camelina by RAPD markers and flow cytometry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 156(3), 67.
- Biglari farash, R., Kheiri, A. and sani khani, M. (2024). The use of leaf and internode explants and different combinations of growth regulators for callus formation, regeneration and root formation of black bean plant (*Hyoscyamus niger* L.). *Research in Plant Metabolites*, 1(4), 93-111. doi: 10.22034/jrpsm.2024.448661.1034
- Cárdenas-Aquino, M. d. R., Camas-Reyes, A., Valencia-Lozano, E., López-Sánchez, L., Martínez-Antonio, A., & Cabrera-Ponce, J. L. (2023). The Cytokinins BAP and 2-iP modulate different molecular mechanisms on shoot proliferation and Root Development in Lemongrass (*Cymbopogon citratus*). *Plants*, 12(20), 3637 .
- Chai, L. C., Alderson, P. G., & Chin, C. F. (2024). Exogenous Cytokinin Induces Callus and Protocorm-Like-Bodies Formation in In Vitro Root Tips of Vanilla planifolia Andrews. *Tropical Life Sciences Research*, 35(1), 235 .
- del Rivero, N., Agramonte, D., Barbón, R., Camacho, W., Collado, R., Jiménez-Terry, F., Pérez, M. and Gutiérrez, O. (2006). Inducción y formación de callos de *Anthurium andraeanum* variedad 'Lambada' a partir de secciones foliares de plantas in vitro. *Biotechnología Vegetal*, 6 (1). 35-40.
- Elowni, E. E., Abdelnabi, G. H., & Ahmad, M. F. (2024). Sodium hypochlorite: Optimization of application as an exsheathing agent for nematode larvae to minimize the risk of reduced viability. *Veterinary Medicine and Public Health Journal*, 5(3), 216-220 .
- Farsi, M., & Zolali, J. (2003). Principles of plant biotechnology. *Translate Mashhad University Publication*, 495 .
- Fauzan, Y. S. A., & Tajuddin, T. (2017). Efektivitas Merkuri Klorida (HgCl₂) Pada Sterilisasi Tunas Samping Jati (*Tectona Grandis*) In Vitro. *Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia*, 4(2), 78-84 .
- Kalantary, R., & Mashayekhi, M. (2013). Anthurium micropropagation techniques using somatic embryogenesis. *Iran's third national conference on agricultural biotechnology*. <https://civilica.com/doc/204485>
- Khorrani Raad, M., Shoor, M., Hamidoghli, Y., Tehranifar, A., Nemati, S. H., & Salehifar, M. (2011). Effects of Growth Regulators on in vitro Micropropagation of two Commercial Varieties of

Anthurium andraeanum. *Journal Of Horticultural Science*, 25(2), 137-146. <https://doi.org/10.22067/jhorts4.v1390i0.9982>

Kuleshova, T., Panova, G., Gall, N., & Galushko, A. (2023). Concentration cell based on electrogenic processes in the root environment. *Technical Physics Letters*, 49(Suppl 4), S376-S379 .

Li, C., Qiu, J., Huang, S., Yin, J., & Yang, G. (2019). *AaMYB3* interacts with *AabHLH1* to regulate proanthocyanidin accumulation in *Anthurium andraeanum* (Hort.)—another strategy to modulate pigmentation. *Horticulture Research* , 6 .

Li, C., Yang, G., Huang, S., Lü, D., Wang, C., Chen, J., & Yin, J. (2013). Characterisation of flavonoids in anthurium spathes and their contribution to spathe colouration. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 88(2), 208-215 .

Maira, O., Alexander, M., & Vargas, T. E. (2010). Micropropagation and organogenesis of *Anthurium andreanum* Lind cv Rubrun. *Protocols for In Vitro Propagation of Ornamental Plants*, 3-14 .

Martin, K., Joseph, D., Madasser, J., & Philip, V. (2003). Direct shoot regeneration from lamina explants of two commercial cut flower cultivars of *Anthurium andraeanum* Hort. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 39, 500-504 .

Mireles-Ordaz, J., Arellano-Perusquia, A., Espinal-Centeno, A., Sánchez-Segura, L., Estrada-Luna, A. A., & Cruz-Ramírez, A. (2015). Reprogramación celular de embriones de *Anthurium andraeanum* por fitohormonas para micropropagación masiva. *Nova scientia*, 7(15), 49-67 .

Nazir, M., Sadat, S., & Soltani Howyzeh, M. (2019). The effect of different hormone combinations on direct and indirect somatic embryogenesis in *Agave americana*. *Plant Physiology*, 9(2), 2739-2747. <https://doi.org/10.22034/ijpp.2019.664579>

Niazian, M., Howyzeh, M. S., & Sadat-Noori, S. A. (2021). Integrative effects of stress-and stress tolerance-inducing elicitors on in vitro bioactive compounds of ajowan [*Trachyspermum ammi* (L.) Sprague] medicinal plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 146(3), 589-604 .

Osorio-Guarín, J. A., Gopaulchan, D., Quanckenbush, C., Lennon, A. M., Umaharan, P., & Cornejo, O. E. (2021). Comparative transcriptomic analysis reveals key components controlling spathe color in *Anthurium andraeanum* (Hort.). *PloS one*, 16(12), e0261364 .

Praveen, R., & Nair, A. (2014). Callus induction and multiplication of internodal explants of *Myxopyrum smilacifolium* Blume .

RahimBarshi, M. , GhasemNejad, A. , Alizadeh, M. and Yamechi, A. (2024). Effect of salt stress on secondary metabolites and growth behavior of artichoke in vitro. *Research in Plant Metabolites*, 2(1), 19-38. doi: 10.22034/jrpsm.2024.460256.1039

Sadat-Noori, S. A., Niazian, M., Soltani Howyzeh, M., & Amiripoor, M. (2018). *Ajowan Medicinal Plant (Botany, Medicinal Properties, Agronomy, Plant Breeding and Biotechnology)*. Academic Center of Education Culture and Research-Tehran Branch .

Sadat, S., Hoveize, M. S., Mojadam, M., & Marashi, S. K. (2011). The study of callus induction and regeneration potential of sugarcane, varieties SP70-1143 and CP76-331. *World Applies Sciences Journal*, 13(5), 1106-1111 .

Šmeringai, J., Schrupfová, P. P., & Pernisová, M. (2023). Cytokinins—regulators of de novo shoot organogenesis. *Frontiers in plant science*, 14, 1239133 .

Vargas, T. E., Mejías, A., Oropeza, M., & De García, E. (2004). Plant regeneration of *Anthurium andreanum* cv Rubrun. *Electronic Journal of Biotechnology*, 7(3), 10-11 .

Weng, Z., Li, G., Sale, P., & Tang, C. (2022). Application of calcium nitrate with phosphorus promotes rhizosphere alkalization in acid subsoil. *European Journal of Soil Science*, 73(1), e13153 .